

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 7 日 (07.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/085632 A1(51) 国際特許分類⁷:
A61K 35/28, A61P 43/00, G01N 33/15

C12N 5/06,

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004090

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-83106 2003 年 3 月 25 日 (25.03.2003) JP
特願2003-95242 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP

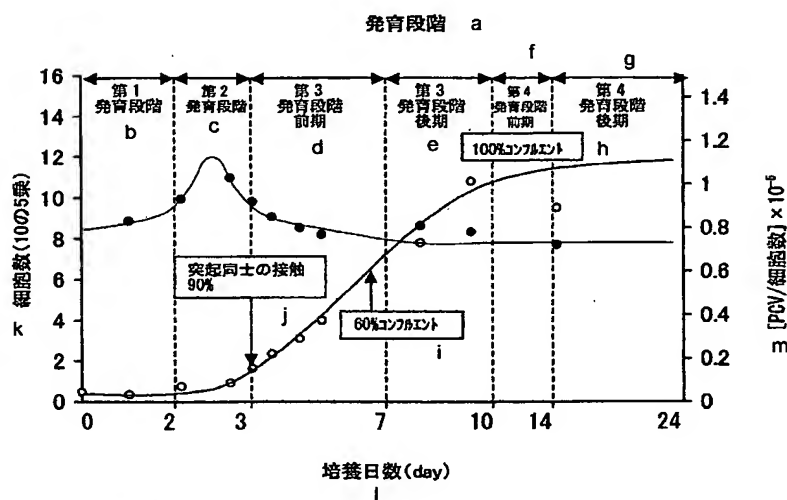
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 帯刀 益夫 (OBI-
NATA, Masuo) [JP/JP]; 〒980-0871 宮城県 仙台市 青葉
区八幡 五丁目 3 番 10-402号 Miyagi (JP). 鈴木 義
久 (SUZUKI, Yoshihisa) [JP/JP]; 〒981-0905 宮城県 仙
台市 青葉区小松島二丁目 11番7号 Miyagi (JP).(74) 代理人: 小田島 平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.);
〒107-0052 東京都 港区 赤坂 1 丁目 9 番 15号 日本
自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: CONTROL OF STEM CELL DIFFERENTIATION INDUCTION AND DIFFERENTIATION POTENCY

(54) 発明の名称: 幹細胞の分化誘導および分化能の制御



- 細胞数 n
- Packed cell volume: PCV

a...STAGE OF GROWTH
b...1st GROWTH STAGE
c...2nd GROWTH STAGE
d...3rd GROWTH STAGE, PRIOR TERM
e...3rd GROWTH STAGE, LATER TERM
f...4th GROWTH STAGE, PRIOR TERM
g...4th GROWTH STAGE, LATER TERM
h...100% CONFLUENT
i...60% CONFLUENT
j...90% CONTACT OF PROJECTIONS WITH EACH OTHER
k...NO. OF CELLS (5th POWER OF 10)
l...CULTURING PERIOD (day)
m...[PCV/NO. OF CELLS] × 10⁵
n...NO. OF CELLS

(57) Abstract: A system for controlling the differentiation potency of animal cells, wherein only in appropriate growth phase of animal cells, the cells are brought into contact with a cytokine, or a combination of two or more cytokines are used during the culturing or multiplication of animal cells in the process of cell differentiation induction.

(57) 要約: 動物細胞の適切な生育フェーズのみにおいて、該細胞をサイトカインと接触させるか、細胞の分化誘導方法動物細胞の培養または増殖に際して2種以上のサイトカインを組み合わせて用いる。動物細胞の分化能を制御するための系の提供。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/085632 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

幹細胞の分化誘導および分化能の制御

5 技術分野

本発明は動物細胞、殊に、多能性幹細胞の培養、維持、増殖、さらには分化誘導に関し、より具体的には再生医療の技術分野で用いることのできる技法に関する。

背景技術

- 10 交通事故やケガで、あるいは病気で心臓、肺、腎臓、血管、消化管、さらには神経等の組織や臓器を欠損させてしまった場合、他人の臓器に頼らず、本人の細胞を利用し、心臓や血管などの欠損組織等に分化する機能を保持した幹細胞や機能細胞を用いて、もとの臓器に再生させる再生医療技術の開発が望まれている。

- このような背景の下、例えば心臓に関しては、心臓の発生・分化に關与する重
15 要な遺伝子が多数単離されている。また、胚性幹細胞（ES細胞）などの多分化能を有する細胞を用い、心筋細胞の発生・分化の解析も行われている。さらに、骨髓細胞を含めた幹細胞が種々の細胞へ分化する多分化能（または多能性）を有することが示唆されている。そして、このような骨髓由来細胞がマウスの生体において
20 ても傷害心筋の再生に寄与し、心機能の改善が認められるとの報告もなされている。

- より具体的には、ES細胞の発生・分化の解析に関して、未分化なネズミES細胞を、サイトカイン、トランスフォーミング増殖因子 β 1（TGF- β スーパーファミリーの構成員、すなわちTGF- β およびBMP2）でプライムして形成される胚様体（embryoid body）は著しく増大した拍動領域を有する心筋への
25 分化を促進することが知られている（例えば、下記の非特許文献1参照。）。このような増殖、分化の重要な制御因子として、サイトカインの各種細胞への作用も調べられている。こうして、サイトカインの機能の多様性および該機能が重複することも知られている。

- 他方、骨髓由来の細胞に関して、温度感受性SV-40T抗原遺伝子のトランスジェニックマウスから樹立され、そして筋形成性、骨形成性および脂肪形成性分化を示す骨髓間質細胞株（TBR細胞株）のあるものは、骨格筋に分化し、そしてその分化はオンコスタチンM（OSM）により刺激されるが、別のTBR細胞株の平滑筋への分化はOSMにより阻害されることが報告されている（例えば、
5 下記の非特許文献2参照。）。なお、TBR細胞株の一般的な作製方法および具体的な株についての詳細も公表されている（例えば、下記の特許文献1、ならびに非特許文献3および4参照。）。非特許文献3および4には、TBR細胞株はT抗原の不活化や増殖条件に応じて表現型変化を示し、脂肪前駆細胞が脂肪細胞
10 および骨形成性細胞に誘導され、いくつかの脂肪前駆細胞および内皮細胞株は筋細胞および脂肪細胞に誘導される、ことも記載されている。このような性質からTBR細胞は多能性間葉系幹細胞由来であることが示唆されている。また、間葉系幹細胞から、骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、間質細胞等へ誘導できることも知られている（下記の非特許文献5参照。）。
15 さらに、心筋細胞への分化能を有する骨髓由来の細胞が5-アザシチジン等のDNAの脱メチル化剤の投与により、確率的（stochastic）に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化することが公表されている（例えば、下記の特許文献2参照。）。
20

- また、特許文献2には、FGF-8、ET1、Midkine、骨形成因子-4（BMP4）の4種類のうちの一種のサイトカインと5-アザシチジンとを組み合わせ
25 て添加することで骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子の発現を促進できることも記載されている。またさらに、特許文献2には、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞を予め5-アザシチジンで処理した後、マウスに移殖すると心筋細胞および血管細胞において移殖細胞に由来する細胞が見られることも示唆している。

特許文献1： 特開平5-292958号公報

特許文献2： 第01/48151号パンフレット、特に4頁2-11行、5
3頁-55頁

非特許文献 1 : The FASEB J. 2002 ; 16 : 1558-1566、要約部

非特許文献 2 : In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal 37 : 698-704

(2001)

非特許文献 3 : J. Cellular Physiology 164 : 55-64 (1995)

5 非特許文献 4 : Experimental Cell Research 218、424-429 (1995)

非特許文献 5 : Science 284、143-147 (1999)

以上述べたとおり、当該技術分野では、ES細胞だけでなく、ある一定の骨髄由来の細胞（造血幹細胞を除く。）が多分化能を有し、特定の分化形質を発現し、
10 機能的な細胞、さらには組織や器官になることが知られており、そして特定の形質ないしは機能または分化の方向性が変化することも示唆されている。なお、特許文献 2 にも、サイトカインの使用により分化の方向性（新しい分化形質の発現性）を変化できることが記載されているが、記載の方法では、原則として、5-アザシチジン（生体内でリン酸化されて核酸に取込まれ、DNA合成を阻害する作用を有する。）との併用が必要である。また、分化の方向性をさらに的確に
15 調節し得る手段が提供できれば当該技術分野の進歩に資することができるであろう。

発明の開示

本発明者らは、多能性幹細胞の分化の方向性および分化の程度にサイトカイン
20 が及ぼす影響について、緻密に検討してきたところ、上述したようなサイトカイン機能の多様性は、異なる細胞間だけでなく、同系統細胞の異なる特定の生育フェーズにおいても観察されることを見出した。また、2種以上のサイトカインを組み合わせる使用することにより、動物細胞の分化の方向性を制御できることを見出した。本発明はこのような知見に基いて完成されたものである。

25 したがって、本発明によれば、多能性幹細胞を発育させる過程で該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法であって、

該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一発育段階、ii) 第二発育段階、

iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

5 該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および／または抑制しうる物質であることを特徴とする細胞の分化誘導方法が提供される。

また、別の態様の本発明として、前記細胞の分化誘導方法を用いる候補作用剤についての細胞分化の促進または抑制能の評価方法であって、該候補作用剤（もしくは被検物質）が多能性幹細胞の前記発育フェーズの最大4つのフェーズにおいて、該細胞と接触されることを特徴とする評価方法が提供される。このような
10 評価方法は、限定されるものでないが、多能性幹細胞の増殖および／または分化を調節しうる後述するサイトカインと同様もしくは向上した物質（ペプチド性もしくは非ペプチド性）のスクリーニングに用いることができる。

さらに、2種以上が組み合わさったサイトカインを有効成分とし、かつ

多能性幹細胞、例えば骨髄間質細胞の3以上の分化の方向性の決定と方向性の
15 決定された各細胞における分化の程度が制御できる、ことを特徴とする哺乳動物細胞の分化を制御するためのサイトカインのセット、を提供する。

また、かようなサイトカインのセットを、イン・ビトロ (in vitro)、エクス・ビボ (ex vivo) およびイン・ビボ (in vivo) からなる群から選ばれる環境下で使用する。このような使用の態様の具体的なものとしては、前記の成分ともなりうるサイトカインやその他の同等な作用を有する作用剤をスクリーニング
20 するための方法、また、直接もしくは間接的な再生医療、例えば、多分化能を有する細胞を生体に移殖する際に、これらの細胞と組み合わせて前記サイトカインのセットを投与するか、あるいはレシピエント本人から採取した細胞を予め前記サイトカインのセットで処理し、所望の分化形質を発現させるか、さらには、特
25 定の機能の細胞もしくは組織まで分化させた後、生体に移殖する方法を挙げることができる。該スクリーニング方法としての好ましい態様としては、(A) 多能性幹細胞、特に温度感受性SV-40T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来の多能性の骨髄間質細胞を用意し、

(B) 該細胞を、分化しうる能力を有することが期待される作用剤の存在下で該細胞を増殖しうる培地で培養し、

(C) 培養細胞の分化の方向性または分化の程度を決定し、そして

(D) こうして決定された分化の方向性または分化の程度についての結果を

- 5 該作用剤の不存在下での該細胞の培養結果と比べ、両結果の差異を該作用剤が骨髄間質細胞の分化能に及ぼす作用の指標とすることを特徴とする脊椎動物細胞の分化能を有する薬剤のスクリーニング方法が提供される。

- さらに好ましい態様としては、上記のBMP-2、BMP-4、OSM、GDF-5およびTGF- β 2から選ばれるサイトカインが比較作用剤として使用される段階を含む。

図面の簡単な説明

図1の(a)は、TBR32-2の分化誘導の結果を示す図に代わる細胞の写真であり、(b)はTBR10-1の分化誘導の結果を示す図に代わる細胞の写真である。

- 15 図2は、TBR32-2の増殖曲線と発育段階を示すグラフである。

図3は、TBR10-1の増殖曲線と発育段階を示すグラフである。

図4の(a)は、例1~5および比較例1についての、そして(b)は例6~12についてのゲル電気泳動後のウエスタン・ブロッティングの結果を示す図に代わる写真である。

- 20 図5の(a)は、例13~17および比較例2についての、そして(b)は例18~24および比較例3についてのゲル電気泳動後のウエスタン・ブロッティングの結果を示す図に代わる写真である。

- 図6は、例25におけるWB法の結果(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、分離したゲル上の蛋白質をメンブレンに転写した)を示す図に変わる写真である。上段：平滑筋(smooth muscle)、下段：骨格筋(skeletal muscle)。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いることのできる多能性幹細胞は、本発明の目的に沿うものであれば、ES細胞を初めとし、いずれかの作用剤により、生来(native)の細胞から、2以上の新しい分化形質が発現し、機能的な細胞または組織や器官になりうる細胞であれば、骨髓、脳、肝臓、その他の臓器から単離できた細胞、さらには該細胞の初代培養細胞、継代培養細胞、不死化細胞のいずれであってもよい。しかし、好ましくは、骨髓由来の間葉系細胞である幹細胞を用いることができる。また、単離または樹立された細胞株であって、予備的に骨髓間質細胞とか、間葉系幹細胞と称されているものであっても、本発明の目的に沿う限り、本発明にいう多能性幹細胞に包含される。

したがって、上記の非特許文献3～4に記載の多能性を示す細胞がより具体的なものとして挙げられる。また、これらに記載の細胞と分化の方向性、分化される程度等について同等の特性をもっていれば、細胞の起源を問うことなく使用でき、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、サル、ヒト等の哺乳動物由来の細胞であることができる。限定されるものでないが、本発明の作用、効果を確認する上で、都合のよい多能性幹細胞としては、前述の非特許文献3または4に記載されているような、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子のトランスジェニックマウスから樹立されたTBR株(または系)と称されているものが挙げられる。なお、これらの非特許文献3および4は、共著者として、本発明者の一人である帯刀益夫博士が含まれているとおり、上記のTBR株の特定の株、例えばTBR31-2、同10-1等は、仙台市青葉区星陵町4-1 東北大学 加齢医学研究所から、試験、研究の目的に使用することを前提に、制限なく分譲される。

このような多能性幹細胞を発育させる過程は、イン・ビトロ(in vitro)、エクス・ビボ(ex vivo) およびイン・ビボ(in vivo) のいずれの発育過程であることができるが、殊に、前二者における発育過程が注視されている。このような発育過程は、細胞の人工的な培養における細胞の各種発育段階(または発育フェーズ)を包含し、具体的には以下の段階からなる。

i) 第一発育段階：若い未熟な、細胞の突起を盛んに伸長させており、かつ増殖段階に入っていない細胞が観察される；

ii) 第二発育段階：細胞数が増大する直前の段階にあり、且つ細胞の突起を盛んに伸長させ、隣接する細胞の突起同士の接触が起こる直前～直後にあり、細胞体積の膨張が最大になった細胞が観察される；

iii) 第三発育段階前期：対数増殖的な発育が開始され、隣接する細胞の突起同士の接触が90%以上起こった状態にある細胞から、細胞本体同士が完全に接触して増殖する面積がない状態を100とした時に、細胞の密度が60%に達した状態にある細胞、すなわち60%コンフルエントの状態になった細胞が観察される；

iv) 第三発育段階後期：対数増殖的に活発に増殖している60%コンフルエント状態の細胞から増殖がとまりつつある100%コンフルエント状態に向かっていく細胞であり、かつ成熟した細胞に向かいつつある細胞が観察される；

v) 第四発育段階前期：100%コンフルエント状態にある細胞が、まだわずかに増殖を行っており、増殖停止直前の細胞が観察される；および

vi) 第四発育段階後期：細胞の増殖段階を終えた成熟した細胞が観察される。
図2および図3も参照されたい。

従来の技術によれば、サイトカインが用いられる場合には、細胞の培養は培養の全期間を通じてサイトカインを含む培地で行われるので、細胞は培養初期から培養終了時まで連続してサイトカインと接触（もしくは曝露）されるが、本発明では、上記の i) ～vi) の発育フェーズのうち、最大で4つのフェーズにおいて細胞が、少なくとも2つの方向への該細胞の分化を促進および／または抑制する物質（好ましくはいずれかのサイトカインである。）と接触されることが重要である。このような接触を行うか否かは、細胞を発育させる過程、典型的には細胞の培養中、例えば2～4日毎に培地の交換が行われるが、この交換培地に前記物質を存在させるか存在させないかによって、容易に行うことができる。最大で4つのフェーズは、例えば、iii) 第三発育段階前期と iv) 第三発育段階後期と v) 第四発育段階前期と vi) 第四発育段階後期、等からなることができるが、

i) 第一発育段階と ii) 第二発育段階と iii) 第三発育段階前期、等の3つのフェーズ、i) 第一発育段階と ii) 第二発育段階、iv) 第三発育段階後期と v) 第四発育段階、等の2つのフェーズ、さらには、前記6つのフェーズのいずれか一つのフェーズをも包含する。

- 5 本発明に従えば、このようないずれかのフェーズにおける培地中に、生育されている細胞に分化誘導を行いうる濃度で、好ましくは、いずれかのサイトカインが加えられる。このようなサイトカインとしては、限定されるものでないが、オンコスタチンM (OSM)、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター5 (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) を挙げることができる。

- 例えば、非特許文献2によれば、前記のTBR31-2の全培養期間（前記のi) ~vi) の発育フェーズ）を通じて該細胞株を連続してOSMと接触させた場合には、上述のごとく、骨形成性分化が刺激（または骨形成細胞への分化誘導が促進）される。しかし、脂肪生成性分化は抑制（または脂肪細胞への分化誘導は抑制）される。これに対し、本発明によれば、OSMを前記のiv) ~vi) の発育フェーズのみならず前記のvi) の発育フェーズのみにおいて存在させたときですらTBR31-2から脂肪細胞への分化誘導は抑制される。さらに重要な知見は、非特許文献2に記載のごとく、TBR31-2を、前記のi) ~vi) の発育フェーズを通じてOSMの存在下で培養すると、平滑筋への分化誘導は抑制されるのに対し、逆に、i) ~iii) の発育フェーズ、またはiii)、iv) およびv) の発育フェーズのいずれか一つの発育フェーズにおいてOSMの存在下でTBR31-2を培養すると平滑筋への分化誘導は促進されることである。

- すなわち、多能性幹細胞の発育系において、該細胞に対するサイトカインの作用を評価しようとする場合には、該細胞とサイトカインの接触のタイミングによって分化誘導の方向性が逆になることがあるのである。かくして、多能性幹細胞に対するサイトカイン等の作用剤の作用を的確に確認するためには、前記のi)

～vi) の6つの発育フェーズにおけるいずれか適当な1～4の発育フェーズにおいて、該作用剤の作用を確認することが好ましい。

それ故、本発明に従う、多能性幹細胞の分化誘導方法を、該細胞に対する各種候補作用剤（または被検物質）の評価に応用すると、かような作用剤の的確な分化誘導能についての評価が可能になる。このような、評価方法においては、培養が容易で、培養結果の評価を容易に行うことのできる、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来の骨髄間質細胞（TBR系細胞）を用いることが便宜である。このような評価方法の好ましく、またはより具体的な態様は、次のように記載することもできる。

10 A) TBR系細胞をそれらの栄養培地で生育させる際に、生育過程もしくは培養における該細胞の i) 第一発育段階、ii) 第二発育段階、iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて、適当な濃度の被検物質の存在下で培養し、

15 B) 培養細胞がいずれかの分化形質を有する細胞に転換するか否か（または培養細胞に分化誘導が生じたか否か）を検出し、

 C) 検出の結果に基づいて、被検物質が多能性幹細胞に対する分化誘導能または細胞の分化の促進もしくは抑制作用を有するか否かを判断する、
 ことを特徴とする評価方法。

20 このような評価方法では、比較またはポジティブ対照として、被検物質を含まず、骨形成因子-2（BMP-2）、骨形成因子-4（BMP-4）、オンコスタチンM（OSM）、グロース・ディファレンシエーション・ファクター（GDF-5）およびトランスフォーミング増殖因子（TGF- β 2）からなる群より選ばれるサイトカインの存在下で上記の培養を行った結果と比較する工程を含めることにより、被検物質の多能性幹細胞に対する作用を、より具体的に評価す
25 ることができる。

他方、2種以上が組み合わさったサイトカインを有効成分として使用する、本発明では、サイトカインの使用は、同時または、時間、場所、等を異にして個別

に使用するものであってよい。また、組み合わせ（またはセットで）使用するが、このような使用が一度なされれば、その後は、いずれか一種のみを使用する場合も、本発明のサイトカインのセットの使用に包含される。例えば、多能性幹細胞の分化の方向性を決定し、そして方向性の程度を制御するのに２種以上のサイトカインを用いた後、最終的な目的に沿うよう、分化した特定の細胞を得る目的で、一種のサイトカインで選択的に増殖分化する場合であっても、これらの全段階は、本発明に従うサイトカインのセットの使用に相当するものと、理解されている。３以上の分化の方向性とは、多能性幹細胞を増殖させた場合に、新たな３種以上の特性（分化形質）が発現されるか、または機能的な細胞もしくは組織や器官を指向する性質を意味し、端的に言えば、いずれかの機能細胞、例えば、平滑筋細胞、骨格筋細胞等に至る性向である。したがって、各分化の程度とは、例えば、平滑筋細胞または骨格筋細胞が対照、例えば、単離された状態にあるサイトカインを添加することなく、血清の存在下での各分化細胞の出現率に比べた場合の出現率の多少を意味する。

かような分化の方向性は、具体的には、多能性幹細胞が平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、内皮細胞または脂肪細胞、等の各分化形質を発現したか、もしくは各分化細胞に至る性質を意味しているが、これらに限定されるものでない。本発明に従う、2以上のサイトカインのセットを使用すれば、上記各分化細胞の少なくとも3種に多能性幹細胞を指向させることができ、そして指向させて得られる各分化細胞の、分化形質の発現の程度もしくは出現の程度を制御できる。これらの程度は、多官能性幹細胞を前記サイトカインが添加されていないが、血清が補足されていること以外、他の培養組成は本質的に同一の培地で培養したときに観察される各分化形質の発現の程度もしくは各分化細胞の出現の程度に比べ、検出できる程度に促進（もしくは増加）または抑制（もしくは減少）していることを意味する。この程度は、前記の血清の存在下でもたらされる分化形質の発現または分化細胞の出現に比べ、少なくとも10%促進または抑制されていることが好ましい。こうして本発明によれば、いずれか特定の分化細胞の出現率または存在の割合を選択的に高めることができる。上記の分化形質の発現の程度および分

化細胞の出現の程度を検出する例は、後述の実施例に特定のものを挙げるが、当該技術分野に周知の如何なる技法に従ってもよい。

本発明では、多能性幹細胞を上記のように誘導できる２種以上のサイトカインの組み合わせ（またはセット）を構成するサイトカインは、本発明の目的に沿う、

5 例えば、直前に記載したような、いずれか特定の分化細胞の出現率または存在の割合を選択的に高めることのできる、ものであれば如何なるサイトカインを使用し、それらを如何に組み合わせたものであってもよい。しかし、このようなサイトカインの例として、限定されるものでないが、骨形成因子－２（BMP－２）、骨形成因子－４（BMP－４）、オンコスチンM（OSM）、グロース・ディフ

10 アレンシエーション・ファクター（GDF－５）およびトランスフォーミン増殖因子（TGF－ β ２）、等を挙げることができる。また、このようなサイトカインの組み合わせの例としては、BMP－２とBMP－４、BMP－２とOSM、BMP－２とTGF－ β ２、BMP－２とBMP－４とOSM、OSM－BMP－４、OSMとTGF－ β ２、OSMとGDF－５、OSMとGDF－５とBM

15 P－４、OSMとGDF－５とTGF－ β ２とBMP－４、BMP－２とOSMとGDF－５とBMP－４およびBMP－２とOSMとGDF－５とTGF－ β ２とBMP－４を挙げることができる。例えば、ある多能性幹細胞（後述する実施例参照）は、BMP－２とOSMとの組み合わせ使用により、高い出現率での自律拍動する心筋細胞への分化能および高い出現率での内皮細胞への分化能を有

20 することが確認できる、したがって、目的に応じて、かような多能性をもつ幹細胞にBMP－２またはOSMを適用するか、あるいはBMP－２およびOSMを適用することができる。

上述した分化誘導方法および評価方法、または２以上のサイトカインの組み合わせ使用に関する系では、TBR系細胞株を初めとする動物細胞を培養すること

25 のできる、それ自体公知の培養条件をそのまま、あるいは改良して用いることができる。例えば、培地としては、基本的には、必須栄養源が添加してあり、アミノ酸では、動物（哺乳類）が合成できない必須アミノ酸のＬ－アルギニン、Ｌ－システイン、Ｌ－チロシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、

- レーリジン、レーメチオニン、レーフェニルアラニン、レースレオニン、レート
リプトファン、レーバリン、レーグルタミンをベースに加えてあり、場合によっ
ては生育を良くする目的で、非必須アミノ酸のレーグリシン、レーセリンも添加
したものであれば、どのような培地でも利用できる。培養温度、等のその他の条
件は、温度条件など、そのほかに、CO₂インキュベーター中の気相のCO₂と共
同して培地のpHを安定化させるために添加する緩衝剤として、細胞が炭酸水素
イオンを必要とすることから、一般的には炭酸水素系の重炭酸ナトリウム溶液を
加えるか、さらにHEPESなど添加して、CO₂インキュベーターから外に取
り出してもpHが安定に保てるようにしてよい。また、適宜、雑菌の汚染を防ぐ
ために、抗生物質を加えてもよい。本発明に従えば、培地から必要に応じて、血
清その他の作用剤を除去し、サイトカインが添加される。他方、in vitro では、
生理学的または使用するサイトカインに悪影響を及ぼさない媒体中にサイトカイ
ンを含むせしめた形態が採用できる。かような媒体の例としては、限定されるも
のでないが、無菌水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水であることができる。
- in vitro および ex vivo で使用する場合の各サイトカインの使用量は、後述
する実施例における使用量を参照して、必要があれば、さらに小実験を行って最
適量を決定すればよい。in vivo で使用する場合通常0.1 ng/ml ~ 20
ng/mlの用量であることができる。他方、培養温度は、33℃~37℃であ
ることができる。
- また、分化誘導の生じた細胞の同定方法は、それ自体既知の方法によることが
でき、具体例としては後述する実施例に記載の方法によればよい。
- さらなる別の態様の本発明として、前記の分化誘導方法により得られた分化細
胞を主体とする再生医療用調製物も提供できる。こうして、本発明によれば、心
臓、毛細血管、動脈及び静脈などの血管系の臓器、胃、食道、結腸、直腸、小腸、
大腸などの消化器系の臓器、手足の筋肉、気管、子宮、膣や脂肪組織などの再生
医療に利用できる手段が提供できる。
- また、上記の評価方法によれば、各分化の程度を制御できる作用剤のスクリー
ニング系を構築できる。

一方、2種以上のサイトカインのセットは、上記の無菌水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水と組み合わせて、または組み合わせることなく、生体に悪影響を及ぼさない物質のマトリックス中に存在させ、徐放性の形態で用いてもよい。このようなマトリックスを形成する物質としては、ポリ乳酸（多孔体）、コラーゲン、コラーゲンスポンジ、ペーター三リン酸カルシウム、多孔質ハイドロキシアパタイト、ポリ乳酸マイクロスフェア、ポリ乳酸コーティングゼラチンスポンジ、乳酸－エチレングリコール共重合体、アガロース、ポリビニルアルコール、アルギン酸、アガロース／ヘパリン、アミロペクチン、フィブリンゲル、コラーゲンミニペレット、エチレン－酢酸ビニル共重合体、乳酸－グリコール酸共重合体、キトサン、乳酸／グリコール酸－エチレングリコール共重合体、チタンインプラントなどを挙げることができる。

また、*in vitro* で2種以上のサイトカインを組み合わせるか、またはセットで用いる場合は、殊に、簡便に使用、操作のできる本発明者の一部によって提供された、上記のTBR間質細胞株を利用して、多態性幹細胞の分化の方向性を決定でき、さらに方向性の決定された各分化の程度を制御できる作用剤のスクリーニング系を構築できる。かようなスクリーニング系において、本発明に従うサイトカインのセットは、比較試料として使用できる。例えば、スクリーニングにかけるべき作用剤の候補物質（例えば、TBR株を分化誘導しうることが期待できる候補作用剤）の存在下で多態性幹細胞を培養する代わりに、上記のサイトカインの一種または二種以上の存在下での培養結果を、該候補物質の作用を評価する上での標準（もしくは基準）とすることにより、多態性幹細胞を所期の分化方向へ分化誘導するのに役立つ作用剤が効率よくスクリーニングできる。なお、かようなスクリーニング系で使用できる培養条件は上述したものに基づくことができる。

以下、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものでない。

（１）：分化誘導された細胞または分化細胞の同定または検出

- (1-1) 平滑筋細胞については、60mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape) を示す細胞を観察し、その培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現するミオシン軽鎖キナーゼ (sm-MLCK) または α -アクチン (α -sm-Actin) を検出するために、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、分離したゲル上の蛋白質をメンブレンに転写し (WB法)、メンブレン上のsm-MLCKに特異的に反応する一次抗体 (Sigma 製、Monoclonal Anti-Myosin Light Chain Kinase, mouse IgG 2b, clone K36, Product No. M7905) または α -sm-Actinに特異的に反応する一次抗体 (Sigma 製、Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, mouse IgG 2a isotype, clone 1A4, Product No. A2547) とそれを検出するための horseradish peroxidase (HRP) で標識した二次抗体 (ICN製、Goat, anti-mouse IgG F(ab')₂, IgG、カタログNo. 55553) を使用することによって同定した。
- (1-2) 培養ディッシュ中の細胞核の観察は培養液の除去後、濃度1 μ g/mlに調製した染色液ヨウ化プロピジウム (PI) を添加し、染色液との反応処理を室温で5分間行い、染色液を除去しリン酸緩衝液 (PBS) を用いて洗浄した。PBSによる洗浄処理は各々5分間、3回行った。(1-3) 骨化細胞については、骨芽細胞にはアルカリホスファターゼ (以下ALP) が比較的高濃度に存在し、さらにヒドロキシアパタイトの形をとったカルシウムが沈着していることが知られているので、前者のALP染色法、及び後者のコッサ反応によって骨化細胞を同定した。このHRP標識の二次抗体の検出は化学発光検出試薬 (アマシャム製、ECL Plus ウェスタンブロットティング検出キットによる化学発光をX線フィルム (コダック製、XAR-5) で行った。まずALP法について、60mmプラスチック培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3分間ずつ3回洗浄した後、70%冷エタノール溶液を用いて、氷上で10分間静置して固定し、次いで蒸留水で3回洗浄した後に、表-1に示したALP反応液を注加し37°C下で4時間静置した。

表-1 ALP反応液

試 薬			
0.05M トリス 塩酸緩衝液 (pH8.5)	A液: 0.2M トリス 水溶液	トリス(ヒドロキシメ チル)アミノメタン 2.42gを蒸留水100ml に溶かす。	A液50mlとB液 19.2mlを混和し、 全量を200mlとす る。
	B液: 0.2M 塩酸	塩酸(36.7%、比重1.19) 1.68mlを蒸留水に加 え、100mlとする。	
反応液	基質のナフトール AS-BI リン酸ナトリウム塩5.0mgをDMSO 0.25mlに溶かす。これに蒸留水を25ml添加し、0.05M トリス 塩酸緩衝液 (pH8.5) 25mlを加えて混和し、この溶液にファース スト赤TR塩30mgを溶かす。		

- この間、顕微鏡でピンク色に細胞が染色されているかの観察を適宜行った。蒸留水で3回洗浄した後、マイヤーのヘマトキシリン溶液（和光純薬工業株式会社製 病理研究用 No. 131-09665）を注加し、室温に5分間放置して核染色を行った。軽く水洗いし、ぬるま湯に漬けて色だしを行った。最後に蒸留水で3回洗浄した。コッサ反応について、60mmプラスチック培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3分間づつ3回洗浄した後、10%冷ホルマリン溶液を用いて、氷上で10分間静置して固定し、次いで蒸留水で2回洗浄した。5%硝酸銀溶液を注加し、部屋の間接光下でカルシウム沈着部が黒褐色になるまで反応させた後、蒸留水で3回洗浄した。ついで5%チオ硫酸ナトリウム溶液に注加し、3分間静置して定着処理を行った後、蒸留水による洗浄を3回行った。さらに、対比染色のために、表-2に示したケルンエヒトロート液（を加え5分間静置した後に、蒸留水で3回洗浄した。骨化細胞の評価は顕微鏡による観察によって行った。

表-2 コッサ反応

試 薬	調 製 方 法
5%硝酸銀液(使用直前に調製)	硝酸銀5gを蒸留水100mlに溶かす。
5%チオ硫酸ナトリウム液	チオ硫酸ナトリウム5gを蒸留水100mlに溶かす。
ケルンエヒトロート液	ケルンエヒトロート0.1g(メルク製)、硫酸アルミニウム5gをそれぞれ、蒸留水100mlに煮沸溶解し、冷却し濾過する。

(1-4) 内皮細胞については、35mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に敷石(cobblestone)状の形態を示す細胞を観察し、1,1'-ジオクタデシル-3,3,3'-テトラメチルインドカルボシアニ
 5 ンパークロレート標識アセチル低密度リポ蛋白(DiI-Ac-LDL: 製品No. L-3484、Molecular Probes 製, USA)の取り込み能を確認することにより同定した。具体的には培養ディッシュ中の培養液を細胞に傷を付けないように吸い取って捨て、無血清培地で $10\mu\text{g/ml}$ に調製したDiI-Ac-LDLを添加し4時間、 33°C で培養した。PBSにて5分間3回洗浄する
 10 ことによって取り込まなかったDiI-Ac-LDLを除き、3%フォルムアルデヒド溶液を添加し、20分間室温に放置して固定した。蒸留水で洗浄した後、ローダミンフィルターを用い、蛍光顕微鏡で観察した。

(1-5) 脂肪細胞については、培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に脂肪球を持った細胞を観察し、オイルレッド染色法によって同定した。培養ディ
 15 ャ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3分間ずつ3回洗浄した後、3%のホルマリン溶液を用いて、10分間室温に静置して固定し、次いで80%のイソプロパノールによって1分間置換し、 37°C で10分間、オイルレッドで染色した。さらに60%イソプロパノールを使って1分間分別した後、3分間ずつ2回洗浄し、最後に核染色のためにマイヤのヘマトキシリン溶液(和
 20 光製)によって10分間処理し、2分間流水で洗浄した後に、顕微鏡学的に赤く

染まった脂肪細胞を確認した。また、この脂肪細胞は成熟すると明確な脂肪球を持った細胞に発育するので、染色しなくとも脂肪細胞として容易に判定できた。

- (1-6) 細胞の測定については、培養液を除去した後に、1 ml の EDTA・トリプシン溶液 (0.02 g EDTA・3 Na / 100 ml の PBS 溶液、
5 0.002 g トリプシン / 100 ml の PBS 溶液) を添加し細胞を洗浄した。
この洗浄操作は細胞が剥がれる前にすばやく2回行うが、トリプシン溶液を添加し、まんべんなく細胞表面に広がった直後にトリプシン溶液をパスツールピペットですばやく吸い取り除去した。次いで顕微鏡で細胞が完全に剥がれているのを確認後、RITC 培地 5 ml を 60 mm プラスティッシュに添加し、ピペットの
10 出し入れで洗い剥ぎ取った細胞を 10 ml 遠沈管に移し、その溶液中の細胞数を 60 mm ディッシュ当たりの数に換算した。細胞数の測定はエルマのビルケルチュルク血球計算盤を用いて行った。

- 細胞の体積 (packed cell volume ; PCV) の測定については、上記のようにして調製した溶液中の細胞数を 4 ml 当たりの数に換算した。その後、ヘマトクリット遠沈管 (1 メモリ = 1 μ l、全容量 10 μ l) に、その溶液 4 ml を添加
15 し、1000 rpm で3分間遠心し、沈下した細胞の体積を読みとり、細胞数 10⁵ 個当たりの体積を測定した。使用した遠心機は日立工機 (株) 製、CF7D である。

(2) : 細胞の培養

- 20 (2-1) 比較培養

- 下記表-3に示す2% FBS の RITC 80-7 培地 (以下、RITC 培地) を用い、90 mm プラスチックディッシュで細胞同士がくっ付き合う直前のサブ
コンフルエント状態 (80% 程度のコンフルエント) まで培養した。培養液を除去した後に、1 ml の EDTA・トリプシン溶液 (0.02 g EDTA・3 Na
25 / 100 ml の PBS 溶液、0.002 g トリプシン / 100 ml の PBS 溶液) を添加し細胞を洗浄した。この洗浄操作は細胞が剥がれる前にすばやく2回
行うが、トリプシン溶液を添加し、まんべんなく細胞表面に広がった直後にトリプシン溶液をパスツールピペットですばやく吸い取り除去した。次いで顕微鏡で

細胞が完全に剥がれているのを確認後、再び表－３に示すＲＩＴＣ培地を添加し、細胞濃度を 1.2×10^4 個／ｍｌに調製した。この細胞浮遊液４．０ｍｌを６０ｍｍプラスチックディッシュに添加し、細胞を均質に分散させた後、３３℃で培養した。

表－３ ＲＩＴＣ８０－７培地

項 目	添加量／ミリＱ水 1000ml	備 考
水酸化ナトリウム	0.3 g	和光純薬（特級）
重炭酸ナトリウム（特級）	1.4 g	和光純薬（特級）
ＨＥＰＳ	3.3 g	シグマ、No. H-3375
ＲＩＴＣ８０－７	9.83 g	岩城硝子（株）No. 99-591-PS
トランスフェリン (10mg/ml)	1ml	ITOHAM FOODS INC. No. 30601293
r h E G F (10 μ g/ml)	1ml	RSD, No. 236-EG-200
インシュリン(1mg/ml)	1ml	Shimizu Seiyaku Co. Ltd. Batch No. DC18B
F B S (ウシ胎仔血清)	20ml	Gibco, BRL, lot No. A0247611

5

細胞の分化能に及ぼすサイトカイン類の添加の効果について、細胞培養には表－３に示したＲＩＴＣ培地を用い、培養開始１２時間後に新しいＲＩＴＣ培地に交換した。培地交換を３日または４日毎に行った。サイトカイン類の添加は培地交換の都度に行い、その量は表－４に示すとおりである。

表－４ サイトカインの添加量

種 類	調製濃度	添加量／4.0ml培地	最終濃度	備 考
BMP-2	10 μ g/ml	8 μ l	(20ng/ml)	RSD製
OSM	25 μ g/ml	1.6 μ l	(10ng/ml)	同上
GDF-5	50 μ g/ml	0.8 μ l	(10ng/ml)	同上
TGF- β 2	1 μ g/ml	20 μ l	(5ng/ml)	同上
BMP-4	10 μ g/ml	8 μ l	(20ng/ml)	同上

また、細胞分化の判定は以下に記述する基準によって行った。すなわち平滑筋については、顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape) を示す細胞を観察し、更にその培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現するミオシン軽鎖キナーゼ蛋白質または α -アクチン蛋白の発現を上述のWB法で判定した。脂肪細胞については、脂肪球を形成している単位当たり (3.8 mm²) の細胞数を測定し、その平均値を求めた。

- (2-2) 例1～12 (例1～5は参考例)、および比較例1～2に使用した株化した間葉系幹細胞TBR31-2は上述の非特許文献3または4に記載されたとおり1995年に樹立され、脂肪及び骨細胞への分化能を有することが示された。本発明者らは同株と下記の表－5に示した α -MEM培地と高い血清濃度のウシ胎仔血清 (10% FBS) を用いて培養条件を詳細に研究し、脂肪及び骨細胞に平滑筋や内皮細胞を加えた4つの表現型に分化する能力をもつ幹細胞であることを明らかにし (図1aおよび表－6参照)、さらにこれらの分化の比率を、無血清または低濃度血清0.7% FBSのRITC培地とサイトカイン類によって自由に変えることができる技術を開発した (例1～5)。すなわち、平滑筋細胞の分化マーカーである α -アクチンの発現 (表－6および図4 (a) 参照) と脂肪細胞への分化の結果が示すように (例1～5)、例1のOSMは平滑筋及び脂肪細胞への分化を共に抑制するが、例2のBMP-2及び例3のBMP-4は平滑筋、及び脂肪細胞への分化を共に促進する。一方、例4のGDF-5は平滑

筋への分化を抑制するが、脂肪への分化を促進し、逆に例5のTGF- β 2は平滑筋への分化を促進するが、脂肪細胞への分化を抑制する。

表-5 α -MEM 培地

項 目	添加量/ミリQ 水1000ml	備 考
重炭酸水素ナトリウム	2.2 g	和光純薬(特級)
α -MEM	10.1 g	和光純薬(特級)
2-メルカプトエタノール (100mM)	0.25 ml	シグマ, No. M-6250
FBS (ウシ胎仔血清)	1.00 ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

表-6 間葉系幹細胞 TBR 31-2 の平滑筋、骨及び脂肪細胞への分化に及ぼすサイトカイン類の影響 (RITC 80-7、37°C、25日間)

分化能	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5	比較例 1
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- β 2 (10ng/ml)	
平滑筋 (α -sm-Actin)	—	+++	+++	±	++++	++
脂肪細胞 **	0	413	689	117	0	15

* : () 内の数値は添加した培地中の最終濃度を示す。

** : 3.8 mm²あたりの脂肪細胞数を万遍なく5箇所測定し、その平均値を示す。

- 5 記号 : 図4 (a) による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actinの発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。++++ : かなり強く発現、+

++：強い発現、++：やや強い発現、+：明らかな発現、±：弱い明らかな発現、－：全く発現していない。

- 5 このように、分化の方向をサイトカインの組合わせによって、自由に制御できる。言い方を変えれば、未分化の状態にある細胞を分化させずに、あるいは機能的に分化した細胞でも機能を維持したまま、維持・増幅も可能である。

（２－３） これらの分化制御は連続的にサイトカイン類を与えたものであるが、必ずしも連続的にサイトカイン類を与える必要がなく、与えるタイミングを選ぶことによって分化の制御が可能である。このことについて、TBR31-2とTBR10-1株を例に具体的に述べる。

- 10 （２－３－１） 以下にTBR31-2の発育段階を図２に従って説明する。

第１発育段階：若い未熟な、細胞の突起を盛んに伸長させており、かつ増殖段階に入っていない細胞。

- 15 第２発育段階：細胞数が増大する直前の段階にあり、且つ細胞の突起を盛んに伸長させ、隣接する細胞の突起同士の接触が起こる直前～直後にあり、細胞体積の膨張が最大になった細胞。

第３発育段階前期：対数増殖的な発育が開始され、隣接する細胞の突起同士の接触が９０％以上起こった状態にある細胞から、細胞本体同士が完全に接触して増殖する面積がない状態を１００とした時に、細胞の密度が６０％に達した状態にある細胞、すなわち６０％コンフルエントの状態になる細胞。

- 20 第３発育段階後期：対数増殖的に活発に増殖している６０％コンフルエント状態の細胞から増殖がとまりつつある１００コンフルエント状態に向かっている細胞であり、かつ成熟した細胞に向かいつつある細胞。

第４発育段階前期：１００％コンフルエント状態にある細胞が、まだわずかに増殖を行っており、増殖停止直前の細胞。

- 25 第４発育段階後期：細胞の増殖段階を終えた成熟した細胞。

まず、当該株の４つの発育段階におけるOSMの平滑筋及び脂肪細胞への分化に及ぼす影響について述べる。平滑筋及び脂肪細胞への分化抑制がOSMによって起こることは先の実施例１で示したとおりであるが、平滑筋細胞と骨化細胞の

分化抑制は発育段階で異なる。すなわち、平滑筋細胞の分化について、24日間連続してOSMを与えると、平滑筋細胞への分化が抑制されるが（例6、例1の繰り返し）、この抑制効果は第3発育段階後期以降のうち、特に第4発育段階の後期のみを与えるだけで得られる（例8と12）。しかしながら、第1から第3

- 5 発育段階前期の間で連続的にOSMを与えると、平滑筋分化が逆に促進される（例7）。一方、脂肪細胞の分化について、24日間連続してOSMを与えると、脂肪細胞への分化が抑制されるが（例6）、この抑制効果は第3発育段階及び第4発育段階前記を除くすべての発育段階で抑制される（例7、8、9及び12）。

- しかしながら、第3発育段階の後期～第4発育段階前期でOSMを与えると、
10 脂肪細胞への分化が促進される（例10、11）。

- このように、幹細胞の発育段階における平滑筋細胞への分化抑制は増殖段階を終えた成熟した細胞で起こり（第4発育段階）、脂肪細胞への分化抑制は増殖を終えた、成熟した細胞で起こった（第4発育段階後期）。また平滑筋細胞への分化促進はまだ未熟な状態にある細胞から活発に増殖している対数増殖期にある細胞
15 胞で起こり（第1～3発育段階）、脂肪細胞への分化促進は増殖が停止する直前の成熟した細胞に向いつつある細胞で起こる（第3発育段階後期～第4発育段階後期）。結果は表-7（または図4（b））を参照されたい。

表一7 間葉系幹細胞 TBR31-2 の平滑筋及び脂肪への分化に及ぼす
OSM の効果 (RITC80-7、37℃、24 日間)

	発育段階と OSM 処理(—)						分化能	
	第 1	第 2	第 3 前期	第 3 後期	第 4 前期	第 4 後期	平滑筋 (α -アクチン)	脂肪細胞
例 6							—	0 *
例 7				+++	8
例 8					+	2
例 9							++	1 2
例 10							++	1 9
例 11							++	3 0
例 12							+	5
比較例 2	++	1 6

* : 3.8mm²あたりの脂肪細胞数を万遍なく 5箇所測定し、その平均値を示す。

記号：図 4 (b) による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actin の発現を化学発光
によって検出したときの発現量の程度を示す。+++：強い発現、++：やや強
い発現、+：明らかな発現、—：全く発現していない。

これらの結果が示すように、幹細胞の発育過程の各段階に応じてサイトカイン
類の効果が異なり、与えるタイミングを選択することによって平滑筋細胞と脂肪
細胞への分化の比率を自由に制御することができる。

(2-3-2) 別の細胞株である TBR10-1 を例に述べる。例 13~24
(例 13~17 は参考例)、および比較例 2 に使用した株化した間葉系幹細胞 T
BR10-1 は前述の非特許文献 3 または 4 に記載されているとおりのものであ
り、平滑筋細胞へと分化することが示された (FEBS Letters 481: 193-
196、2000)。本発明者は同株と表一5に示す α -MEM 培地と高い血清
濃度のウシ胎仔血清 (10% FBS) を用いて培養条件を詳細に研究し、平滑筋
細胞のほかに骨化細胞及び内皮細胞に分化することを見出し、3つの表現型に分
化する能力をもつ多能性幹細胞であることを明らかにした (図 1-b および表一
8 参照)。さらにこれらの分化の比率を、無血清または低濃度血清 0.7% FBS

SのRITC培地とサイトカイン類によって自由に変えることができる技術を開発した。

表－8 間葉系幹細胞 TBR 10-1 の平滑筋、骨への分化に及ぼす
サイトカイン類の影響 (RITC 80-7、37℃、14日間)

分化能	例 1 3	例 1 4	例 1 5	例 1 6	例 1 7	比較例 3
	OSM (10ng/ml) *	BMP-2 (20ng/ml)	BMP-4 (20ng/ml)	GDF-5 (100ng/ml)	TGF- β 2 (10ng/ml)	
平滑筋 (sm-MLCK)	－	++	++	++	－	±
骨化(A1P 活 性の細胞%)	10	0	2	9	0	0

* : () 内の数値は添加した培地中の最終濃度を示す。

記号 : 図 5 (a) による、平滑筋の分化マーカーsm-M L C Kの発現を化学発
5 光によって検出したときの発現量の程度を示す。++ : やや強い発現、± : 弱い
が明らかな発現、－ : 全く発現していない。

すなわち、平滑筋細胞の分化マーカーであるミオシン軽鎖キナーゼ蛋白の発現
と骨化細胞への分化の結果が示すように (例 1 3 ～ 1 7 ; 表－8 および図 5

(a) 参照) 、当該株の平滑筋への分化はOSMとTGF- β 2によって阻害さ
10 れる。しかし、BMP-2、BMP-4及びGDF-5存在下では、平滑筋への
分化を促進する。一方、滑化細胞への分化はOSMとGDF-5の存在下で促進
される。特に、OSMによって平滑筋と骨化細胞への分化が互いに逆方向に誘導
されることから、骨分化と平滑筋分化は密接な関係で制御されていることを意味
し、骨化と平滑筋化の分化能を異にする幹細胞の分化段階が複数存在する可能性
15 がある。

TBR 1 0 - 1 株の例では、当該幹細胞の発育過程は図 3 に示すとおり、大きく
4 つの段階に分けることが可能である。以下、各生育相についての詳細は、T B
R 3 2 - 1 の生育相についての説明を参照されたい。

- 例 18～24（下記表－9 および図 5（b）参照）に示すように、TBR 10-1 株の発育過程の各段階に応じてサイトカイン類を与えると、連続して与えたときと全く異なる分化方向を示す。すなわち、連続して BMP-2 を与えると、平滑筋分化が優位に進行する。また BMP-2 による平滑筋の分化の促進効果は、必ずしも連続して与える必要がなく、細胞増殖が盛んな第 3 発育段階から成熟した細胞にある第 4 発育段階でも優位に認められる。未成熟な細胞にある第 1～2 の発育段階では、BMP-2 による平滑筋への分化促進効果は観察されない（例 19）。

表－9 間葉系幹細胞 TBR 10-1 の平滑筋の分化に及ぼす BMP-2 の効果
(RITC 80-7、33℃、15日間)

	発育段階とBMP-2 処理（－）						分 化 能
	第 1	第 2	第 3 前期	第 3 後期	第 4 前期	第 4 後期	平滑筋 (sm-MLCK)
例 18							+++
例 19							+
例 20							++
例 21							++
例 22							++
例 23							++
例 24							++
比較例 4							±

- 10 記号：図 5（b）による、平滑筋の分化マーカー α -sm-Actin の発現を化学発光によって検出したときの発現量の程度を示す。+++：強い発現、++：やや強い発現、+：明らかな発現、±：弱い明らかな発現、－：全く発現していない。

- 以上より、本発明に従えば、例えば OSM の脂肪細胞への分化に対する効果の例（例 6～12）に示すように、幹細胞の培養系をマイクロウェルなどを用いて

分化誘導物質や抑制物質などの新薬の開発する場合、幹細胞のどの発育段階を選択して新薬を評価するかが重要であり、選択する発育段階によって、スクリーニングされる検体の評価が全く逆の結果になる。また再生医療分野における細胞移植用として細胞を提供する場合、これらサイトカイン類の種類の選択や濃度、添加のタイミングを制御して培養することにより、最適な分化段階にある細胞の提供が可能になる。例えば、血管を構成する内皮細胞と平滑筋への適度の分化度合を兼ね備えた、あるいは、内皮細胞、平滑筋及び心筋の適度の分化度合を兼ね備えた細胞の提供が可能である。

10 例 25：細胞株 TBR52 が多能性を有することの確認

(1) 本実施例では細胞株 TBR52 (上述の非特許文献 3 および 4 参照。) を使用し、培地は下記の表 10 に示される組成を有する α -MEM 培地を使用した。

表 10 α -MEM 培地

項 目	添加量／ミリ Q 水 1000ml	備 考
重炭酸水素ナトリウム	2.2 g	和光純薬(特級)
α -MEM	10.1 g	和光純薬(特級)
2-メルカプトエタノール (100mM)	0.25 ml	シグマ, No. M-6250
FBS (ウシ胎仔血清)	1.00 ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

15 (2) TBR52 の分化能

以下に記載するウェスタンブロッティング法 (WB)、免疫染色法および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法などの同定方法の組み合わせによって同定した。(2-1) 平滑筋細胞については、35mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape)

20 を示す細胞を観察し、その培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現するミオシン軽鎖キナーゼ (sm-MCK) を検出するため

に、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、分離したゲル上の蛋白質をメンブレンに転写し（WB法）、メンブレン上のsm-MLCKに特異的に反応する一次抗体（Sigma 製、Monoclonal Anti-Myosin Light Chain Kinase, mouse IgG2b, clone K36, Product No. M7905）

- 5 とそれを検出するためのホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）で標識した二次抗体（ICN製、Goat, anti-mouse IgG F(ab)2, IgG、カタログNo. 55553）を使用することによって同定した。

- （2-2）骨格筋細胞については、35mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に多核で筋管（myotube）状、かつ横紋筋型構造を示す細胞を観察して確認し、上述と同様の方法によって培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から骨格筋細胞に特異的に発現する速筋型骨格筋ミオシン重鎖II（skeletal Myosin Heavy Chain II, fast）をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって蛋白質を分離し、当該ミオシン重鎖IIに特異的に反応する一次抗体 Monoclonal Anti-Skeletal Myosin (fast)（Sigma 製、mouse IgG, clone MY32, M4276）とそれを検出するためのホースラデッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）で標識した抗マウスの二次抗体（ICN製、Goat, anti-mouse IgG F(ab)2, IgG、No. 55553）を使用することによって同定した。培養ディッシュ中の細胞核の観察は培養液の除去後、濃度1g/mlに調製した染色液ヨウ化プロピジウム（PI）を添加し、染色液との反応処理を室温で5分間行い、染色液を除去しリン酸緩液（PBS）を用いて洗浄した。PBSによる洗浄処理は各々5分間、3回行った。
- 10
15
20

- また、速筋型骨格筋ミオシン重鎖II蛋白の発現の確認は常法に従い免疫染色によって行った。具体的には、35mmプラスチックディッシュ内の25mm Poly-L lysine コートカバーグラス（4925-040、旭テクノグラス、東京）上に培養した細胞集団をリン酸緩液（PBS）を用いて洗浄し、2.5%パラフォルムアルデヒドを1.5ml用い、4℃下で15分間固定した。PBSによって5分間、3回洗浄した後、0.1% Triton X-100を含む1.5mlのPBSを用い、室温下で3分間の穿孔処置を行った。PBSを用い、5分
- 25

間3回洗浄した後、5%スキムミルクを含むPBS（以下5%スキンミルク-PBSと記す）1.5mlを添加し、4℃下で30分間処理した。上述の速筋型骨格筋ミオシン重鎖I1に特異的に反応する抗体 Monoclonal Anti-Skeletal Myosin (fast) (Sigma 製、mouse IgG1, clone MY32, Product No.

- 5 M4276) を5%スキムミルク-PBSで1:50に希釈し、これを一次抗体として用いた。先の30分間処理で用いた5%スキンミルク-PBS 1.5mlをこの一次抗体1.5mlに置換し、4℃下で約14時間反応させた。その後、PBSを用い、5分間3回洗浄した。二次抗体としては5%スキムミルク-PBSを用いて、Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識の抗マウス抗体
- 10 (Sigma 製、Goat, anti-mouse IgG-Fab, F8711) を1:200に希釈した。この二次抗体1.5mlを用い、4℃下で30分間反応させ、次いでPBSを用いて5分間3回洗浄した後、反転し VECTASHIELD (H-1000、Vector Laboratories, Burlingame, USA) をはさみスライドグラス上にマウントした。倒立蛍光顕微鏡を用いて速筋型骨格筋ミオシン重鎖I1の蛋白の発現
- 15 を確認した。

- (2-3) 心筋細胞については、35mmプラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に単核で棍棒状 (rod shape) の形態を有し、自律的に周期的な収縮 (拍動) をする細胞を観察し、WB法を用い上述と同様の手順で従い、心筋特異的なコネキシン43蛋白質の発現を確認した。ただし、一次抗
- 20 体として抗コネキシン 43 (Chemicon 製、製品 No. MAB3068) を使用し、二次抗体としては抗マウスの二次抗体 (ICN製、Goat, anti-mouse IgG F(ab')₂, IgG No. 55553) を使用した。さらにRT-PCR法によってNkx2.5遺伝子、 α ミオシン重鎖遺伝子の発現を確認することで同定した。

- 25 その手順はRT-PCRキット (GibcoBRL 製、商品 No. 11904-018) に添付のマニュアルに従った。培養ディッシュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで3回洗浄した。この洗浄した細胞中の総RNAを、RNA抽出試薬 Isogen (ニッポンジーン製) を用いたチオシアン酸グアニジ

ン・フェノール・クロロフォルム法によって回収した。次いで回収した $2.5 \mu\text{g}$ のトータルRNAをRT-PCRキット添付のマニュアルに従い、Oligo (dT) 法によってcDNAを作成し、DEPC水で10倍に調整した。このcDNA $1 \mu\text{l}$ を鋳型として10倍PCR緩衝液 $1 \mu\text{l}$ 、 25mM MgCl_2 $1 \mu\text{l}$ 、 8mM dNTP $0.5 \mu\text{l}$ 、フォーワードプライマー (Forward Primer) ($10 \text{pmol}/\mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ 、リバーズプライマー (Reverse Primer) ($10 \text{pmol}/\mu\text{l}$) $0.5 \mu\text{l}$ 、AmpliTaq Gold DNA Polymerase (アプライドバイオシステムズジャパン、東京) $0.1 \mu\text{l}$ 、及びDEPC水 $5.4 \mu\text{l}$ の全量 $10 \mu\text{l}$ の反応液を調製し遺伝子の増幅反応 (PCR) を行った。PCRは GenAmp 9700サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズジャパン、東京) を用い、 95°C 5分の後サイクル数は30回で各々の条件でおこなった。その後、2%アガロースゲルに標準マーカールと共に電気泳動し、PCR産物をUV光下にて確認した。遺伝子の増幅反応に用いた各々のプライマーの塩基配列は下記のとおりである。

遺伝子	Forward Primer	Reverse Primer
Nkx 2.5	CCGCCGCCTCCGCCAACAGCAACT ¹⁾	GGGTGGGTGGGCGACGGCAAGACA ²⁾
α ミオシン重鎖	GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG ³⁾	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG ⁴⁾

1) 配列番号：1、2) 配列番号：2、3) 配列番号：3、4) 配列番号：4

(2-4) 内皮細胞については、 35mm プラスチックディッシュに培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に敷石 (cobblestone) 状の形態を示す細胞を観察し、 $1, 1'$ -ジオクタデシル-3, 3, 3' -テトラメチルインドカルボシアニンパークロレート標識アセチル化低密度リポ蛋白質 (DiI-Ac-LDL: 製品No. L-3484、Molecular Probes 製、USA) の取り込み能を確認することにより同定した。具体的には培養ディッシュ中の培養液を細胞に傷を付けないように吸い取って捨て、無血清培地で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製したDiI-Ac-LDLを添加し4時間、 33°C で培養した。PBSにて5分間3回洗浄することによって取り込まなかったDiI-Ac-LDLを除き、3%フォルム

アルデヒド溶液を添加し、20分間室温に放置して固定した。蒸留水で洗浄した後、ローダミンフィルターを用い、蛍光顕微鏡で観察した。

(2-5) 脂肪細胞については、培養した細胞集団のなかに顕微鏡学的に脂肪球を持った細胞を観察し、オイルレッド染色法によって同定した。培養ディッ

- 5 ュ中の培養液を除去しディッシュ底に付着した細胞をPBSで8分間ずつ8回洗浄した後、3%のホルマリン溶液を用いて、10分間室温に静置して固定し、次いで80%のイソプロパノールによって1分間置換し、37℃で10分間、オイルレッドで染色した。さらに60%イソプロパノールを使って1分間分別した後、
- 10 3分間ずつ2回洗浄し、最後に核染色のためにマイヤのヘマトキシリン溶液(和光製)によって、10分間処理し、2分間流水で洗浄した後に、顕微鏡学的に赤く染まった脂肪細胞を確認した。また、この脂肪細胞は成熟すると明確な脂肪球を持った細胞に発育するので、染色しなくても脂肪細胞として容易に判定できた。

実施例26~30: サイトカインによる分化の制御

- 試験すべきサイトカインは、下記の表-11に示される組成を有するRITC
- 15 80-7培地に添加して、各サイトカインの添加効果を確認した。

表-11 RITC80-7培地

項 目	添加量/ミリQ 水1000ml	備 考
水酸化ナトリウム	0.3 g	和光純薬(特級)
重炭酸ナトリウム(特級)	1.4 g	和光純薬(特級)
HEPS	3.3 g	シグマ, No. H-3375
PITC80-7	9.83 g	旭テクリグラスNo.
トランスフェリン(10mg/ml)	1 ml	ITOHAM FOODS INC. No. 30601293
rhEGF(10 μ g/ml)	1 ml	RSD No. 236-EG-200
インシュリン(1mg/ml)	1 ml	Shimizu Seiyaku Co. Ltd. Batch No. DC18B
FBS(ウシ胎仔血清)	20 ml	Gibco, BRL lot No. A0247611

- RITC80-7培地を用い、TBR52を90mmプラスチックディッシュで細胞同士がくっ付き合う直前のサブコンフルエント状態（80%程度のコンフルエント）まで培養した。培養液を除去した後に、1mlのEDTA・トリプシン溶液（0.02g EDTA・3Na/100mlのPBS溶液、0.002g
- 5 トリプシン/100mlのPBS溶液）を添加し細胞を洗浄した。この洗浄操作は細胞が剥がれる前にすばやく2回行うが、トリプシン溶液を添加し、まんべんなく細胞表面に広がった直後にトリプシン溶液をパスツールピペットですばやく吸い取り除去した。次いで顕微鏡で細胞が完全に剥がれているのを確認後、表-
- 10 10で示した α -MEM培地を添加し、細胞濃度を 3×10^5 個/mlに調製した。この細胞浮遊液1.5mlを35mmプラスチックディッシュに添加した。この時、35mmプラスチックディッシュには、25mm Poly-L lysine コートカバーグラス（4925-040、旭テクノグラス、東京）を前もって敷いておいた。 α -MEM培地の添加24時間後に新しい α -MEM培地に交換した。培地交換は2日または3日毎に30日間行った。
- 15 細胞の分化能に及ぼすサイトカイン類の添加の効果について、細胞培養には α -MEM培地を用い、 α -MEM培地の添加24時間後に新しい α -MEM培地に交換した。培地交換を2日または3日毎に30日間行った。サイトカイン類の添加は培地交換の都度に行い、その量は下記の表-12に示すとおりであった。

表-12 サイトカインの添加量

種 類	調製濃度	添加量/1.5ml	最終濃度	備 考
BMP-2	10 μ g/ml	3 μ l	(20ng/ml)	RSD 製
OSM	25 μ g/ml	0.6 μ l	(10ng/ml)	同上
GDF-5	50 μ g/ml	0.3 μ l	(10ng/ml)	同上
TGF- β 2	1 μ g/ml	7.5 μ l	(5ng/ml)	同上
BMP-4	10 μ g/ml	3 μ l	(20ng/ml)	同上

また、細胞分化の判定は以下に記述する基準によって行った。すなわち平滑筋については、顕微鏡学的に単核で紡錘形 (spindle shape) を示す細胞を観察し、単面積あたりに占める面積を目視で測定し、その平均値を%で表した。更にその培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から平滑筋細胞に特異的に発現する

5 ミオシン軽鎖キナーゼ蛋白の発現を上述のWB法で判定した。骨格筋については、顕微鏡学的に多核で筋骨 (myotube) 状、かつ横紋筋型構造を示す細胞を観察し、単面積あたりに占める面積を目視で測定し、その平均値を%で表した。更に培養細胞集団から抽出した蛋白質混合物から骨格筋細胞に特異的に発現する速筋型骨格筋ミオシン重鎖 I I (skeletal Myosin Heavy Chain II, fast) 蛋白の発現を

10 上述のWB法で判定した。これらのWB法の結果を示す図に代わる写真を図6として示す。心筋細胞については、顕微鏡学的に単核で棍棒状 (rod shape) の形態を有し、自律的に周期的な収縮 (拍動) をする細胞を観察し、単位面積あたりの自律的、周期的に拍動する細長い混紡状の細胞数を計数し、その平均値を求めた。内皮細胞については、顕微鏡学的に敷石 (cobblestone) 状の形態を示す細胞

15 を観察し、単面積あたりに占める面積を目視で測定し、その平均値を%で表した。脂肪細胞については、脂肪球を形成している単位当たりの細胞数を測定し、その平均値を求めた。結果を表-13および表-14にまとめて示す。

表-13 多能性幹細胞の分化能

分化能	実施例2 BMP-2	実施例3 OSM	実施例4 GDF-5	実施例5 TCF- β 2	実施例6 BMP-4	比較例
平滑筋様細胞 (%)	25	30	24	10	30	20
骨格筋様細胞	3.2	0	4.0	0	3.0	4.4
心筋 (拍動細胞数)	27.8	1.2	4.8	0	1.4	2.5
内皮 (%)	32	76	67	73	74	75
脂肪細胞数	5.6**	0	14.0	0	101.8	8.2

単位面積：3.8mm²、**：未成熟

表-14 WBの結果(図-1の転記)

分化能	実施例2 BMP-2	実施例3 OSM	実施例4 GDF-5	実施例5 TCF- β 2	実施例6 BMP-4	比較例
平滑筋細胞	++	++	++	±	+	++
骨格筋細胞	+++	—	+	++	±	++

表-13および表-14から明らかなとおり、例26において培地にBMP-2を加えると、心筋細胞への分化は添加しない比較例の約10倍まで促進された。

- 5 また骨格筋細胞への分化は顕微鏡学的な形態観察では心筋細胞に覆われるなど明確な判定が出来なかったが、WB法の分析結果から、明らかに促進された。平滑筋および内皮細胞への分化はBMP2を添加しても大きな影響を受けなかった。脂肪細胞への分化は細胞数では比較例とほとんど差がないが、BMP2を添加することによって、小さい脂肪球をもった未熟な細胞が観察され脂肪細胞への分化
- 10 が抑制されていた。

例27において、培地にOSMを添加すると、心筋細胞への分化が比較例の

1 / 2 までに抑制された。また、骨格筋及び脂肪細胞への分化はほとんど完全に抑制され、顕微鏡学的な形態的観察からも多核で筋管 (myotube) 状の骨格筋及び脂肪球を含む脂肪細胞は確認されなかった。骨格筋細胞の分化に対するこの抑制効果はWB法による速筋型骨格筋ミオシン重鎖 I I 蛋白の発現の解析からも確認できた。脂肪細胞への分化も O S M の添加によって抑制された。しかし、平滑筋と内皮細胞への分化に対してはほとんど影響しなかった。

例 2 8 において、培地に G D F 5 を添加すると、心筋細胞及び脂肪細胞への分化がわずかに促進した。しかしながら、G D F 5 の添加は骨格筋細胞に特異的な速筋型骨格筋ミオシン重鎖 I I 蛋白の発現を抑制した。平滑筋及び内皮細胞の分化は、G D F 5 の添加によって影響されなかった。

また、例 2 9 において、培地に T G F - β 2 を添加すると、平滑筋、心筋及び脂肪細胞への分化は抑制されたが、内皮細胞への分化は影響されなかった。骨格筋細胞への分化は、顕微鏡による形態学的観察から、全く骨格筋細胞の形態を表す細胞を観察することが出来なかったが、骨格筋細胞に特異的な速筋型骨格筋ミオシン重鎖 I I 蛋白の発現がWB法では促進的であった。しかし、この蛋白発現に対しては現時点、明確な説明ができないが、骨格筋細胞への分化の過程で起こる形態学的な細胞融合と骨格筋分化の初期誘導期の関係を明らかにする鍵になるかもしれない。

さらに例 3 0 において、B M P 4 を培地に添加すると、無添加の比較例から明らかのように、脂肪細胞への分化が 1 0 倍以上の比率で促進されたが、平滑筋および骨格筋細胞への分化はWB法による解析によって抑制されることが分かった。また心筋細胞の特徴である自律的な拍動細胞数も少なく心筋細胞への分化は抑制された。内皮細胞への分化に対する B M P 4 の添加はほとんど影響しなかった。

これらの結果は多分化能を有する幹細胞に、各種サイトカインを与えることによって、ある特定の細胞へと分化の方向を優位に増幅させたり、低減させることが可能であることを示し、さらに添加するサイトカインを組み合わせることによ

て、不要な細胞を抑制し、目的とする細胞のみを優位に増幅させることが可能であることを示している。

請求の範囲

1. 多能性幹細胞を発育させる過程で、該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法であって、

- 5 該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一発育段階、ii) 第二発育段階、iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

10 該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および／または抑制しうる物質であることを特徴とする細胞の分化誘導方法。

2. 多能性幹細胞が、骨髄間質細胞である請求項1記載の細胞の分化誘導方法。

3. 骨髄間質細胞が、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来である請求項2記載の細胞の分化誘導方法。

15 細胞の分化が、少なくとも平滑筋細胞、骨形成細胞および脂肪細胞のいずれか2つの分化細胞に向かう請求項1または2記載の細胞の誘導方法。

5. 作用剤が、細胞の分化の促進または抑制をもたらしうるサイトカインである請求項1～3のいずれかの一つに記載の細胞の誘導方法。

20 サイトカインが、オンコスタチンM (OSM)、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター5 (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) からなる群より選ばれる請求項4記載の細胞の誘導方法。

7. 多能性幹細胞を発育させる過程で、該細胞と作用剤との接触を介することによる該細胞の分化誘導方法を用いる作用剤についての細胞分化の促進または抑制能の評価方法であって、

- 25 該細胞と作用剤との接触が、該細胞の i) 第一発育段階、ii) 第二発育段階、iii) 第三発育段階前期、iv) 第三発育段階後期、v) 第四発育段階前期およびvi) 第四発育段階後期からなる発育フェーズの最大で4つのフェーズにおいて実施され、そして

該作用剤が該細胞を少なくとも2つの方向への細胞の分化を促進および／または抑制することが期待される候補作用物質であることを特徴とする評価方法。

8. 多能性幹細胞が、温度感受性SV-40 T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来である請求項7記載の評価方法。

- 5 9. 候補作用剤による該細胞の分化の程度が、多能性幹細胞を発育させる過程で該細胞が該細胞の分化の促進または抑制をもたらさうるサイトカインと接触されてもたらされる分化の程度と比較される請求項7または8記載の評価方法。

- 10 10. サイトカインが、オンコスタチンM (OSM)、骨形成因子-2 (BMP-2)、骨形成因子-4 (BMP-4)、グロース・ディファレンシエーション・ファクター5 (GDF-5) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 2) からなる群より選ばれる請求項9記載の評価方法。

11. 請求項1、2および4～6のいずれかの一つに記載の細胞の誘導方法により誘導された細胞を主体とする再生医療用調製物。

12. 細胞が哺乳動物由来である請求項11記載の調製物。

- 15 13. 2種以上が組み合わさったサイトカインを有効成分とし、かつ 骨髄間質細胞を包含する多能性幹細胞の3以上の分化の方向性の決定と方向性の決定された各細胞における分化の程度が制御できる、ことを特徴とする哺乳動物細胞の分化を制御するためのサイトカインのセット。

- 20 14. 多能性幹細胞が骨髄間質細胞であり、分化の方向性が3以上である請求項13記載のサイトカインのセット。

15. 前記分化の方向性が、平滑筋細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、内皮細胞および脂肪細胞に向かうことからなる群より選ばれる請求項14または15記載のサイトカインのセット。

- 25 16. 前記各分化の程度が、血清の存在下でもたらされる分化のいずれか一つに比べ少なくとも10%促進または抑制される請求項13～15のいずれかに記載のサイトカインのセット。

17. 2種以上が組み合わさったサイトカインが、骨形成因子-2 (BMP-2) 骨形成因子-4 (BMP-4)、オンコスタチンM (OSM)、グロース・

ディファレンシエーション・ファクター（GDF-5）およびトランスフォーミング増殖因子（TGF- β 2）からなる群より選ばれる請求項 13～16 のいずれかに記載のサイトカインのセット。

18. 組み合わせさせたサイトカインが、BMP-2とBMP-4、BMP-2とOSM、BMP-2とTGF- β 2、BMP-2とBMP-4とOSM、OSM-BMP-4、OSMとTGF- β 2、OSMとGDF-5、OSMとGDF-5とBMP-4、OSMとGDF-5とTGF- β 2とBMP-4、BMP-2とOSMとGDF-5とBMP-4およびBMP-2とOSMとGDF-5とTGF- β 2とBMP-4からなる群より選ばれる請求項 17 記載のサイトカインのセット。

19. 骨髄間質細胞が、BMP-2による刺激により少なくとも平滑筋細胞、拍動する心筋細胞および内皮細胞に分化しうる多能性成体幹細胞である請求項 13～17 のいずれかに記載のサイトカインのセット。

20. 骨髄間質細胞が温度感受性SV-40T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来である請求項 1～6 のいずれかに記載のサイトカインのセット。

21. 骨髄間質細胞の分化が、イン・ビトロ（in vitro）、エクス・ビボ（ex vivo）およびイン・ビボ（in vivo）からなる群から選ばれる環境下で誘導される請求項 1～8 のいずれかに記載のサイトカインのセット。

22. ex vivo または in vivo での骨髄間質細胞の分化が再生医療における細胞移植に際して利用されるものである請求項 13～19 のいずれかに記載のサイトカインのセット。

23. in vitro での骨髄間質細胞の分化が、該細胞を分化しうる能力を有する作用剤をスクリーニングするのに利用されるものである請求項 20 記載のサイトカインのセット。

24. (A) 温度感受性SV-40T抗原遺伝子を担持するトランスジェニックマウス由来の多能性の骨髄間質細胞を用意し、

(B) 該細胞を、分化しうる能力を有することが期待される候補作用剤の存在下で該細胞を増殖しうる培地で培養し、

(C) 培養細胞の分化の方向性または分化の程度を決定し、そして

(D) こうして決定された分化の方向性または分化の程度についての結果を

- 5 該作用剤の不存在下での該細胞の培養結果と比べ、両結果の差異を該作用剤が骨髄間質細胞の分化能に及ぼす作用の指標とすることを特徴とする脊椎動物細胞の分化能を有する薬剤のスクリーニング方法。

25. 比較作用剤として、BMP-2、BMP-4、OSM、GDF-5およびTGF- β 2からなる群から選ばれる少なくとも2種が利用される請求項24記

- 10 載の方法。

26. 無血清培地で培養が行われる請求項25記載のスクリーニング方法。

Fig. 1

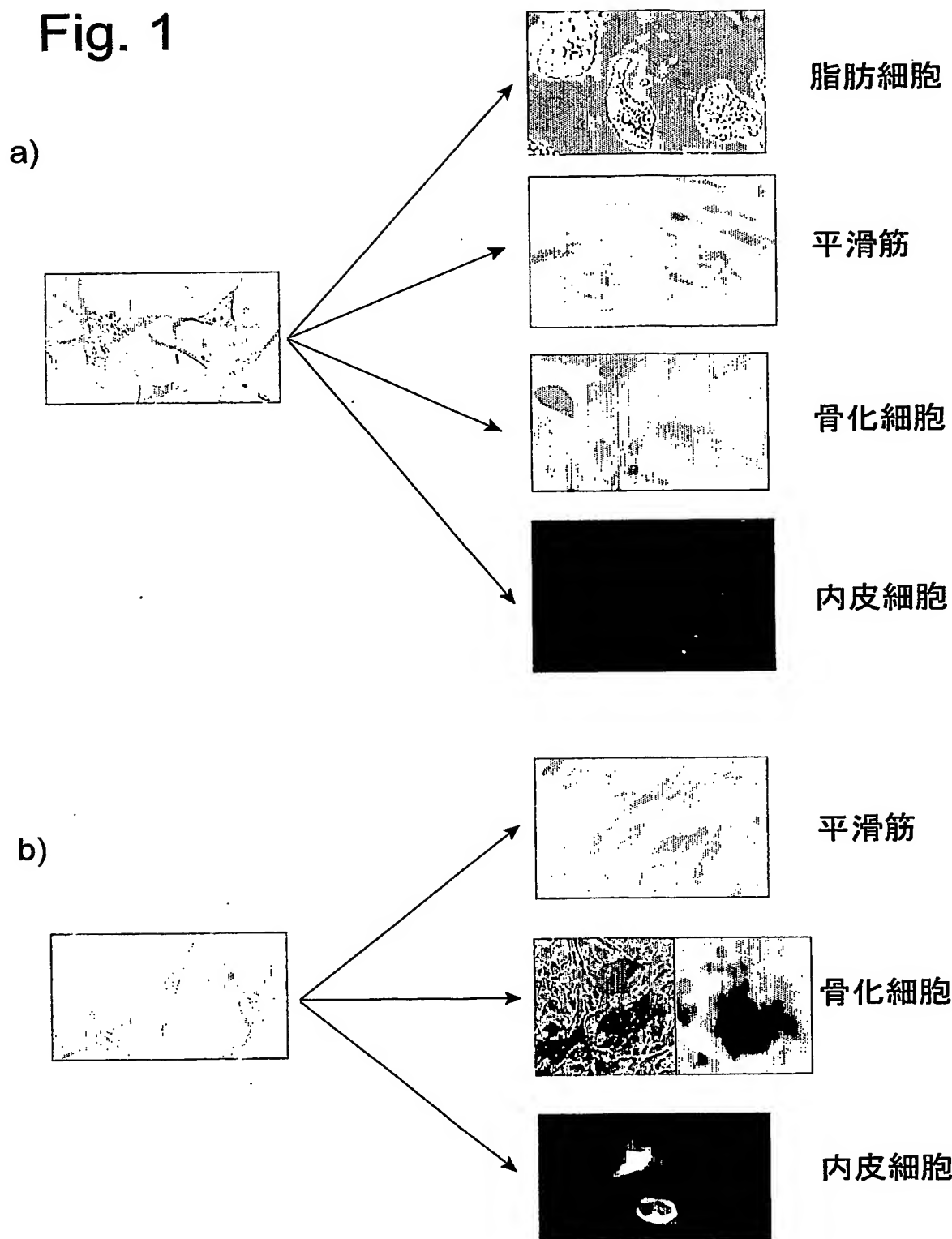
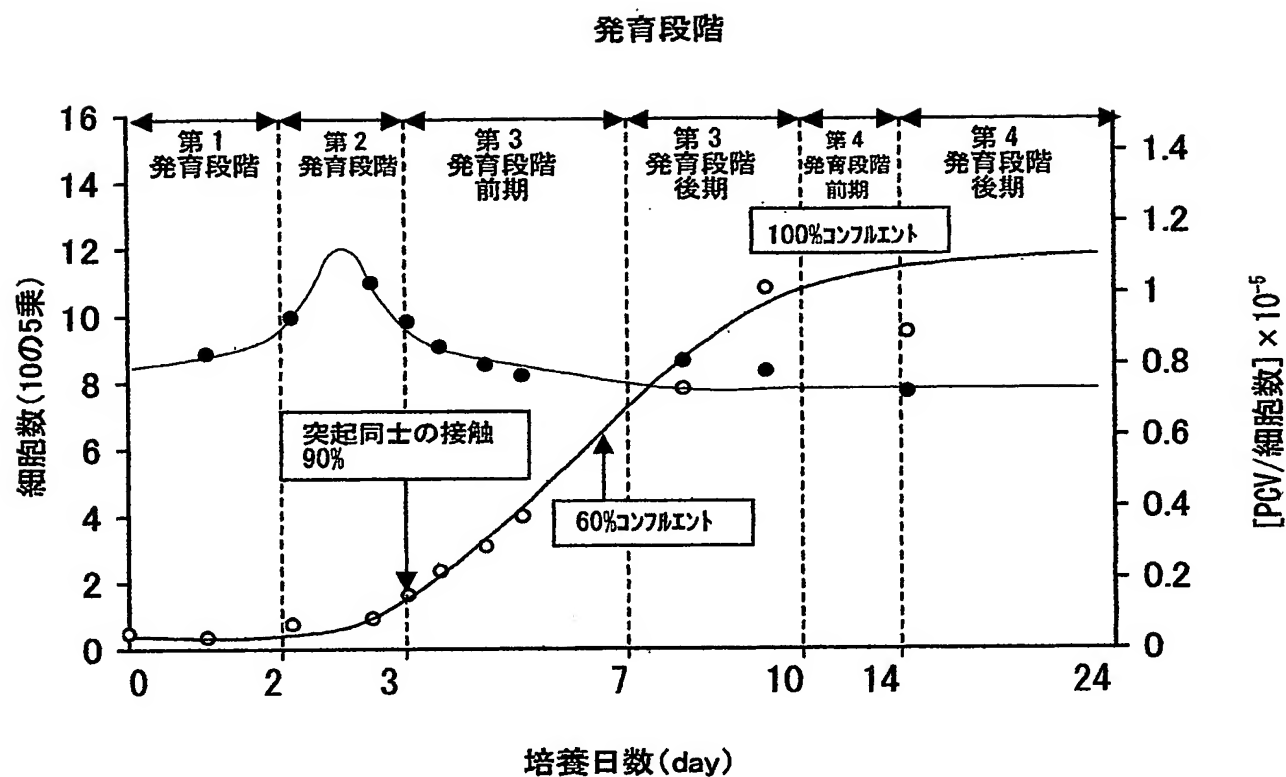
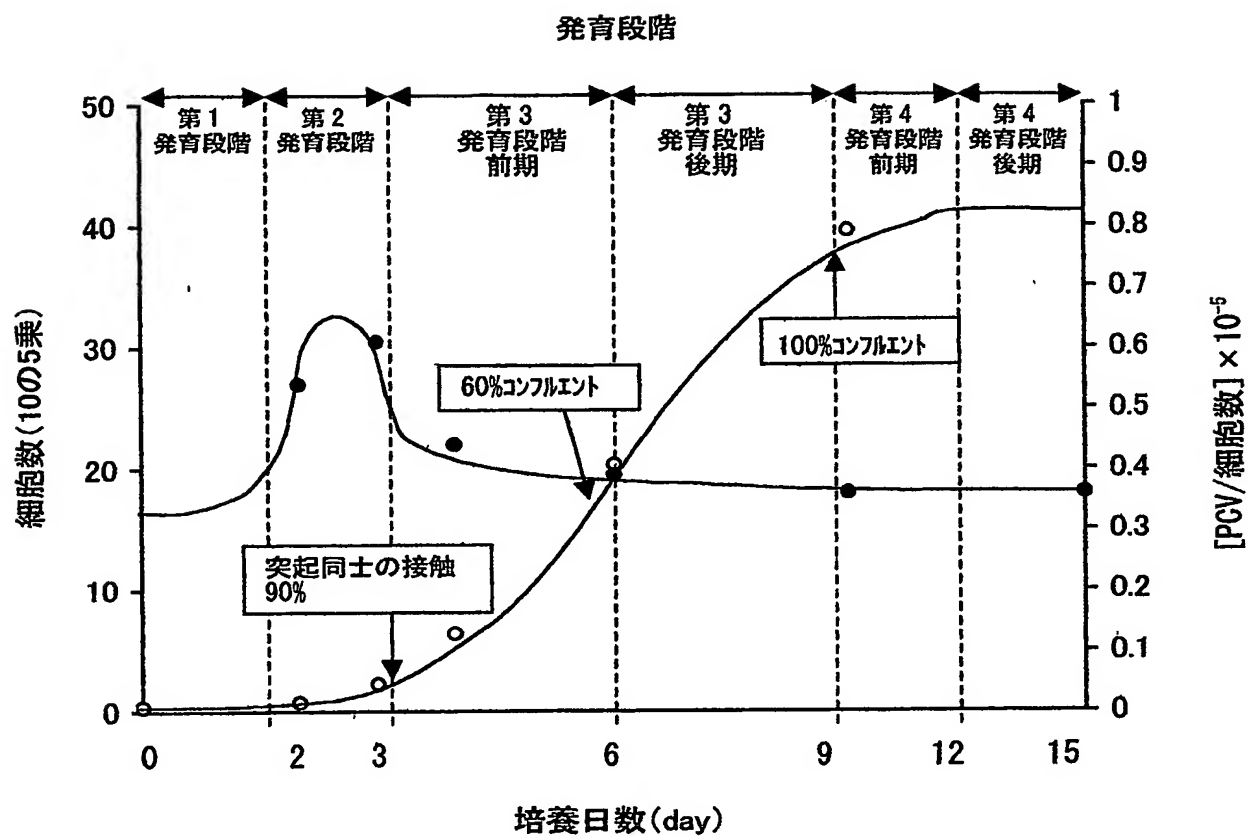


Fig. 2



- 細胞数
- Packed cell volume: PCV

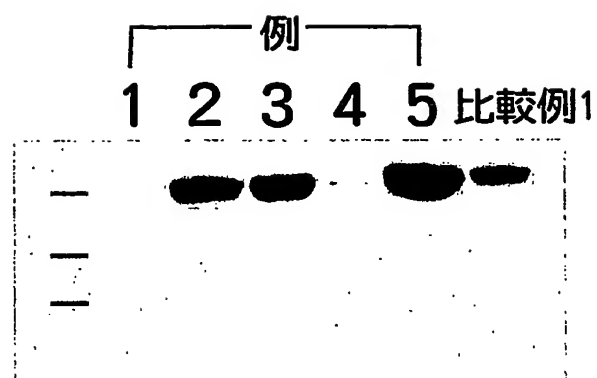
Fig. 3



- 細胞数
- Packed cell volume: PCV

Fig. 4

(a)



(b)

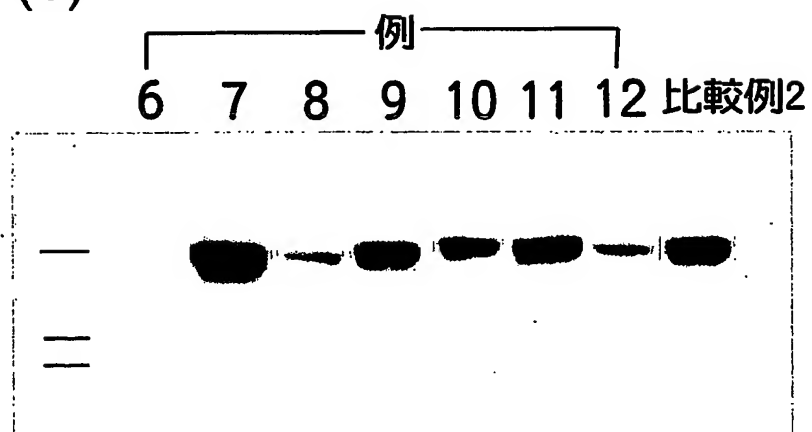
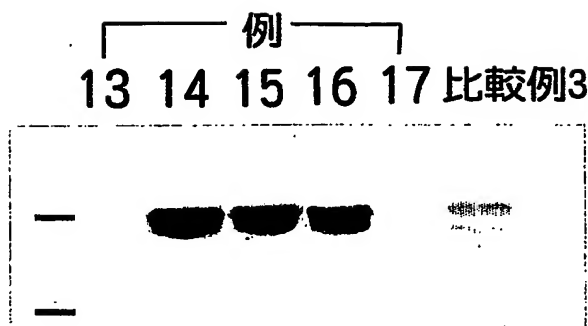


Fig. 5

(a)



(b)

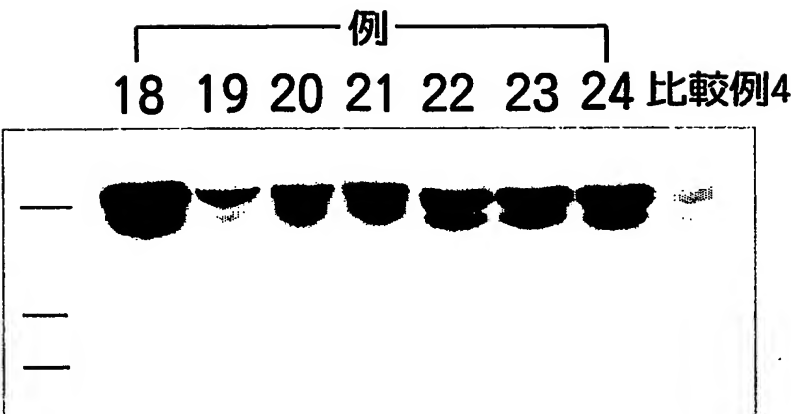
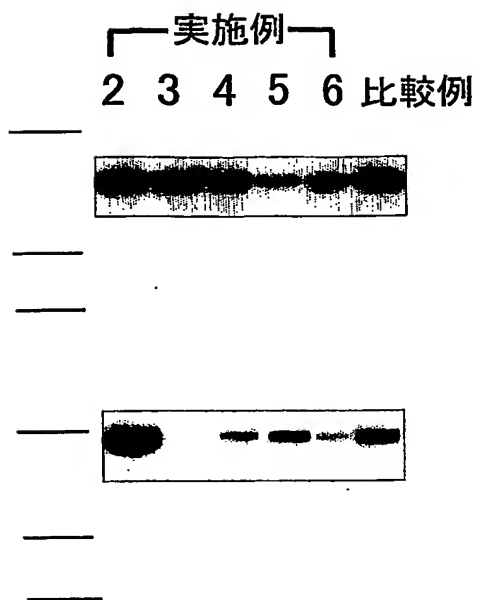


Fig. 6



SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > Japan Science and Technology Agency

< 1 2 0 > 幹細胞の分化誘導および分化能の制御

< 1 3 0 > K-1JST-0S

< 1 5 0 > JP2003/83106

< 1 5 1 > 2003-03-25

< 1 5 0 > JP2003/95242

< 1 5 1 > 2003-03-31

< 1 6 0 > 4

< 2 1 0 > 1

< 2 1 1 > 2 4

< 2 1 2 > D N A

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 2 > マウス N k x 2. 5 遺伝子の 1 1 0 8 番目から 1 5 2 1 番目までの塩基配列を参考にして合成

< 2 2 3 > N C B I Accession No. N M O O 8 7 0 0

< 4 0 0 > 1

ccgccgcctc cgccaacagc aact

2 4

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 2 4

< 2 1 2 > D N A

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 2 > マウス N k x 2. 5 遺伝子の 1 1 0 8 番目から 1 5 2 1 番目までの塩基配列を参考にして合成

< 2 2 3 > N C B I Accession No. N M O O 8 7 0 0

< 4 0 0 > 2

gggtgggtgg gcgacggcaa gaca

2 4

< 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2 4

< 2 1 2 > D N A

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 2 > マウスの α ミオシン重鎖をコードする遺伝子の 5 6 3 0 番目から 5 9 3 1 番目までの配列を参考にして合成

< 2 2 3 > N C B I Accession No. M 7 6 6 0 1

< 4 0 0 > 3

ggaagagtga gcggcgcacg aagg

2 4

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> マウスの α ミオシン重鎖をコードする遺伝子の5630番目から
5931番目までの配列を参考にして合成
<223> NCB1 Accession No. M76601

<400> 4
ctgctggaga gggtattcct cg

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/06, A61K35/28, A61P43/00, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/00-5/10, A61K35/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u>	WO 00/30635 A1 (THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO),	<u>1-2, 4-7,</u>
Y	02 June, 2000 (02.06.00), & AU 200012552 A & AU 764394 B & EP 1131067 A1 & CA 2254429 A1 & JP 2002-530331 A example 3	<u>9-19, 22</u> 3, 8, 24-26
<u>X</u>	EP 748870 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.),	<u>1-2, 4-7,</u>
Y	18 December, 1996 (18.12.96), & JP 9-117288 A & CA 2178256 A Description; page 4, lines 17 to 26	<u>9-16, 19, 22</u> 3, 8, 24
Y	JP 10-113171 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 May, 1998 (06.05.98), (Family: none)	3, 8, 24-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 April, 2004 (16.04.04)Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004090

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/066856 A1 (SUNBIO, INC.), 14 August, 2003 (14:08.03), & JP 2003-144155 A Claim 13	1-2, 4-5, 11-16, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004090

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 20, 21, 23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Although the cytokine set of claims 20, 21 and 23 relates to "cytokine according to any of claims 1 to 6", the invention of claims 1 to 6 is not directed to a cytokine or set thereof. Therefore, the constitution of invention is extremely unclear, and any meaningful opinion cannot be established.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N5/06, A61K35/28, A61P43/00, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N5/00-5/10, A61K35/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 00/30635 A1 (THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO) 2000. 06. 02 &AU 200012552 A &AU 764394 B &EP 1131067 A1 &CA 2254429 A1 &JP 2002-530331 A (実施例3)	1-2, 4-7, 9-19, 22 3, 8, 24-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 04. 2004

国際調査報告の発送日

11. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	EP 748870 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 1996. 12. 18 & JP 9-117288 A & CA 2178256 A (明細書第4頁17-26行)	1-2, 4-7, <u>9-16, 19, 22</u> 3, 8, 24
Y	JP 10-113171 A (第一製薬株式会社) 1998. 05. 06 ファミリー無し	3, 8, 24-26
P, X	WO 03/066856 A1 (SUNBIO, INC.) 2003. 08. 14 & JP 2003-144155 A (特許請求の範囲第13項)	1-2, 4-5, 11-16, 22

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 20, 21, 23 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲20, 21, 23に係るサイトカインのセットは「請求の範囲1～6のいずれかに記載のサイトカイン」に係るものであるが、請求の範囲1～6はサイトカインまたはそのセットに係る発明ではないので、発明の構成が著しく不明瞭であって、有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**